

# Restauration aveugle d'image 3D de microscopie de fluorescence avec prise en compte des aberrations sphériques et contrainte de phase

Saima BEN HADJ<sup>1</sup>, Laure BLANC-FÉRAUD<sup>1</sup> Gilbert ENGLER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Groupe de recherche Morphème - I3S/INRIA/CNRS/IBV/UNS  
2000, route des Lucioles, 06903 Sophia Antipolis Cedex, France

<sup>2</sup>Unité IBSV, INRA, 06903 Sophia Antipolis, France.

Saima.Ben\_Hadj@inria.fr, Laure.Blanc\_Feraud@inria.fr, Gilles.Aubert@unice.fr

**Thème** – Traitement et analyse (Problèmes inverses, déconvolution).

**Problème traité** – Les images tridimensionnelles de microscopie de fluorescence confocale présentent un flou variant en profondeur, dû aux changements d'indice de réfraction dans les chemins optiques, conduisant à des aberrations sphériques du système optique. Notre but est de proposer une méthode de restauration des images de microscopie 3D qui prend en compte ces dégradations variables en profondeur. La difficulté est que ces aberrations dépendent de paramètres liés au spécimen biologique imagé. La fonction de flou (ou PSF pour *Point Spread Function* en anglais) variable spatialement doit donc être estimée spécifiquement pour chaque observation.

**Originalité** – Nous avons développé une méthode d'estimation conjointe du spécimen biologique (image restaurée) et de la PSF 3D dont la variation en profondeur est modélisée par une combinaison convexe d'un ensemble de PSFs invariante spatialement [1]. Dans ce travail nous ajoutons une contrainte de phase sur la PSF, contrainte qui nous est donnée par la géométrie du système optique qui est connue. La difficulté est d'estimer la phase de la PSF à partir de son intensité afin de prendre en compte cette contrainte de phase dans l'estimation conjointe de l'image et de la PSF.

**Résultats** – Nous proposons un algorithme de restauration d'image biologique 3D avec prise en compte de la variation en profondeur de la PSF 3D, incluant une contrainte de phase sur la PSF. Nous montrons sur des simulations l'amélioration obtenue sur l'estimation des PSF 3D. Des résultats sur des données réelles seront inclus dans la version finale.

## 1 Introduction

La microscopie de fluorescence confocale permet d'imager des échantillons biologiques 3D vivants, à une résolution de quelques centaines de nanomètres. Ces images ont principalement deux types de distorsion : un flou variable en profondeur dû aux changements d'indice de réfraction dans les chemins optiques, conduisant à des aberrations sphériques du système optique, et un bruit de Poisson dû au processus de comptage de photons au niveau du détecteur. La question de la connaissance de la PSF est cruciale pour la restauration de ces images. Il existe des modèles mathématiques de la physique d'acquisition définissant cette PSF 3D, comme par exemple le modèle [5] que nous utilisons pour les simulations. La difficulté est que ce modèle dépend de paramètres physiques qui sont parfois inconnus, en particulier les paramètres liés au spécimen biologique comme son indice de réfraction. De plus l'estimation précise des PSF en chaque point de l'image 3D est un problème hautement sous-déterminé. C'est pourquoi dans des travaux antérieurs, nous avons approché la PSF 3D par une PSF variant uniquement en fonction de la profondeur, et modélisée par une combinaison convexe d'un ensemble de PSFs spatialement invariantes. Une méthode d'estimation conjointe du spécimen biologique (image restaurée) et de la PSF 3D ainsi modélisée a été proposée dans [1]. Cette méthode minimise un critère joint entre la PSF variable et l'image restaurée, comprenant des termes de régularisation de type TV sur l'image et norme  $l^2$  du gradient sur les PSF, avec des contraintes (positivité sur les 2 types de variables, somme des coefficients égaux à un pour la PSF), afin de réduire l'ensemble des solutions possibles. Dans ce travail, nous proposons de rajouter une contrainte supplémentaire sur la phase des PSF. En effet, le modèle de PSF issu de la physique en microscopie confocale est défini à partir d'une fonction complexe [3, 5], la PSF 3D finale en étant le module puissance 4. Ainsi il est possible d'incorporer une contrainte de phase supplémentaire dans le modèle, contrainte de support donnée par l'ouverture du système optique qui est connue. Nous proposons d'utiliser l'algorithme d'estimation alterné sur l'image et les PSF présenté dans [1], et d'y ajouter une étape d'estimation de la phase par un algorithme

de Gersberg-Saxon (GS) [4] permettant l'introduction de la contrainte de support sur la phase donnée par l'ouverture numérique du système optique. Nous développons le modèle et l'algorithme d'estimation utilisé et montrons des résultats sur des simulations montrant l'intérêt de la prise en compte de cette contrainte supplémentaire.

## 2 Critère MAPJ

Soient  $f$  et  $g$  deux fonctions à variable dans  $\mathcal{I} \subset \mathbb{N}^3$ , désignant respectivement l'image original et l'image dégradée. Le modèle d'observation est donnée par la statistique de Poisson suivante :  $g(x, y, z) \sim \mathcal{P}(\tilde{H}(f)(x, y, z) + b_g)$  où  $b_g > 0$  est une constante modélisant le bruit de fond, provenant de l'auto-fluorescence du spécimen ou de la diffusion de la lumière, celle-ci peut être estimée à partir d'une région homogène de l'image ne contenant pas l'objet. L'opérateur de flou  $\tilde{H}$  variable en profondeur peut être modélisé par l'équation suivante [1] :  $\tilde{H}(f) = \sum_{1 \leq i \leq M} h^i * (\psi^i \cdot f)$  où  $h^i, i = 1, \dots, M$  est un ensemble de PSFs

SI prises à différentes profondeurs, et  $\psi^i : \mathcal{I} \rightarrow [0, 1], 1 \leq i \leq M$  est un ensemble de fonctions de pondération telles que  $\sum_{1 \leq i \leq M} \psi^i(x, y, z) = 1$ . Le choix des fonctions de pondération est discuté dans [3] où les auteurs ont montré que des fonctions linéaires suffisent pour obtenir une bonne restauration. Nous considérons alors des fonctions  $\psi^i(x, y, z)$  qui varient linéairement suivant l'axe ( $OZ$ ) et constantes suivant les axes ( $OX$ ) et ( $OY$ ). En fixant les fonctions de pondération, les PSFs  $h^i$  et l'image  $f$  peuvent être estimées par minimisation du critère suivant [1] :

$$J(f, h^1, \dots, h^M) = \sum_{(x,y,z) \in \mathcal{I}} \left[ \tilde{H}(f)(x, y, z) - g(x, y, z) \log(\tilde{H}(f)(x, y, z) + b_g) \right] + \alpha \|\nabla f\|_1 + \sum_{1 \leq i \leq M} \beta^i \|\nabla h^i\|_2^2 \quad (1)$$

Le premier terme d'attache aux données est lié à la statistique poissonnienne. Le deuxième terme de TV permet de lisser l'image tout en préservant les contours. Le dernier terme permet de pénaliser les PSFs trop étroites, ce qui empêche le flou de rester dans l'image reconstruite.  $\alpha$  et  $\beta^i, i = 1, \dots, M$  sont des paramètres de régularisation. Nous définissons l'ensemble des images admissibles par  $C_f = \{f; f \geq 0; \|f\|_1 = \|g - b_g\|_1\}$ , et l'ensemble des PSFs admissibles par  $C_h = \{h; h \geq 0; \|h\|_1 = 1; \text{supp}(h) \subset B\}$ .

## 3 Modélisation de la PSF en microscopie confocale

La PSF de la microscopie confocale peut être calculée à partir du module d'une fonction complexe  $h_A^i(x, y, z) \in \mathbb{C}$  [3] :  $h^i(x, y, z) = |h_A^i(x, y, z)|^4$ . Comme présenté dans [5],  $h_A^i$  est calculée pour chaque coupe en  $Z$  à partir de la transformée de Fourier inverse d'une fonction bidimensionnelle dite fonction pupille  $P^i(k_x, k_y, z)$  comme suit :  $h_A^i(x, y, z) = TF_{2D}^{-1}(P^i(k_x, k_y, z))$  où  $k_x, k_y$  sont les coordonnées fréquentielles. La fonction  $P(k_x, k_y, z) \in \mathbb{C}$  peut être décomposée en deux termes :  $P^i(k_x, k_y, z) = P_a^i(k_x, k_y) P_d(k_x, k_y)$ , où  $P_d(k_x, k_y) = \exp(2j\pi z \sqrt{(\frac{n_i}{\lambda})^2 - (k_x + k_y)^2})$  est un terme qui modélise la défocalisation de l'optique,  $n_i$  est l'indice de réfraction du milieu d'immersion, et  $\lambda$  la longueur d'onde de la lumière d'émission.  $P_a^i(k_x, k_y) \in \mathbb{C}$  est un terme décrit les aberrations que subit le front d'onde en traversant les différentes couches du système optique. Le support de la fonction pupille que l'on note par  $C$  est un disque de rayon donné par l'ouverture numérique ( $NA$ ) du microscope :  $C = \{(k_x, k_y) \in \mathbb{N}^2; \sqrt{k_x^2 + k_y^2} < \frac{2\pi}{\lambda} NA\}$ . Ainsi, l'estimation des PSFs  $h^i$  se réduit à l'estimation des termes d'aberration  $P_a^i$ .

## 4 Algorithme d'estimation

Nous reprenons l'algorithme d'estimation jointe de l'image et de la PSF proposé dans [1] où le critère (1) est minimisé d'une manière alternée en  $f$ , et en  $h^i, i = 1, \dots, M$ , les contraintes des ensembles  $C_f$  et  $C_h$  étant assurées par un algorithme rapide de gradient projeté [2]. Nous ajoutons à cet algorithme une étape d'estimation du terme  $P_a^i$ , ce qui nous permet d'injecter une contrainte supplémentaire sur les PSFs dans le domaine de Fourier i.e. la contrainte de support de la fonction pupille dont les dimensions sont données par l'ensemble  $C$ . Pour ce faire, nous utilisons l'algorithme GS qui a été précédemment appliqué avec succès dans [4]. Les étapes de l'algorithme proposé dans [1] sont alors modifiées comme suit,  $k$  étant le compteur d'itération :

1. Estimation de l'objet :  $\hat{f}^{(k+1)} = \arg \min_{f \in C_f} J\left(f, \hat{h}^{1(k)}, \dots, \hat{h}^{M(k)}\right)$
2. Estimation des PSFs : pour chaque  $i = 1, \dots, M$ , itérer les étapes suivantes :
  - (a) Estimation de la PSF en intensité :  $\hat{h}^{i(k+1)} = \arg \min_{h^i \in C_h} J\left(\hat{f}^{(k+1)}, \hat{h}^{1(k)}, h^i, \dots, \hat{h}^{M(k)}\right)$
  - (b) Estimation du terme d'aberration  $P_a^i(k_x, k_y)$  à partir de la PSF  $h^i$  par l'algorithme GS (développé ci-dessous).

(c) Calcul de la PSF  $h^i$  à partir du terme d'aberration comme dans la section 3.

L'algorithme GS [4] permet l'estimation de  $P_a^i$  en alternant des contraintes dans les domaines spatial (module de  $h_A^i$  donné par  $h^i$ ) et fréquentiel (support de  $P_a^i$  donnée par  $C$ ) comme suit :

1. Calculer pour chaque coupe en  $z$  la PSF cohérente  $h_A^{i(k+1)}(x, y, z) = TF_{2D}^{-1} \left( P_d(k_x, k_y, z) \cdot P_a^{i(k)}(k_x, k_y) \right)$
2. Remplacer le module de  $h_A^{i(k+1)}$  par  $\sqrt[4]{\hat{h}^{i(k+1)}}$
3. Calculer pour chaque coupe  $z$  le terme  $P_{a,z}^{i(k+1)}(k_x, k_y) = TF_{2D} \left( h_A^{i(k+1)}(x, y, z) \cdot P_d^{-1}(k_x, k_y, z) \right)$ , ensuite calculer  $P_a^{i(k+1)}$  comme étant la moyenne de ces termes calculées pour les différentes  $z$ .
4. Projeter  $P_a^{i(k+1)}$  sur l'ensemble des fonctions de support inclus dans  $C = \{(k_x, k_y) \in \mathbb{N}^2; \sqrt{k_x^2 + k_y^2} < \frac{2\pi}{\lambda} NA\}$ .

## 5 Tests numériques

Nous avons généré numériquement une image 3D de coquille de bille dont une coupe ( $Y, Z$ ) est présentée dans la figure 1 (a). Nous avons dégradée cette image par un flou variable en profondeur (pour chaque coupe en  $z$ , nous avons utilisé une nouvelle PSF calculée par le modèle de [3, 5]) et par un bruit poissonien (cf. figure 1 (b)). Nous avons ensuite restauré cette image par l'algorithme proposé en utilisant une combinaison de 3 PSFs. L'image et l'une des PSFs estimées sont présentées dans les figures 1 (c) et (g). La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus par un algorithme [1] (cf. figures 1 (d) et (h)) et avec les vraies image et PSF (cf. figures 1 (a) et (e)) montrent l'avantage de l'approche proposée. La méthode de GS permet de contraindre la forme de la PSF qui ressemble plus à la vraie PSF. Des résultats sur des images réelles seront présentés dans l'article final.

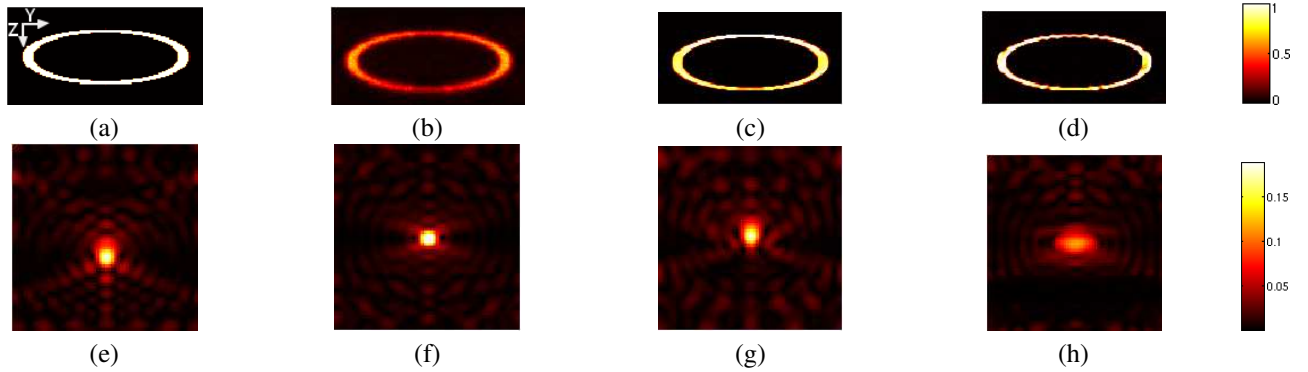


FIGURE 1 – Coupes ( $Y, Z$ ) de l'image originale (a), l'observation (b), l'image (c) et l'une des PSFs (g) estimées par la méthode proposée, l'image (d) et l'une des PSFs (h) estimées par l'algorithme [1], la vraie PSF (e) et la PSF d'initialisation (f).

## Références

- [1] S. Ben Hadj, L. Blanc-Féraud, G. Aubert, *Space Variant Blind Image Restoration*. Rapport de recherche INRIA 8073, Septembre, 2012.
- [2] S. Bonettini, R. Zanella, et L. Zanni. *A scaled gradient projection method for constrained image deblurring*. Inverse Problems, 2009, 25 : 015002.
- [3] A. Egner, et S.W. Hell. *Aberrations in confocal and multi-photon fluorescence microscopy induced by refractive index mismatch*. Handbook of Biological Confocal Microscopy, 2006, 404–413.
- [4] B.M. Hanser, M.G.L. Gustafsson, D.A. Agard et J.W. Sedat. *Phase retrieval for high-numerical-aperture optical systems*. Optics letters, 2003, 28(10) : 801–803.
- [5] P.A. Stokseth. *Properties of a defocused optical system*. JOSA, 1969, 59(10) : 1314–1321.
- [6] S. Yuan, et C. Preza. *3D fluorescence microscopy imaging accounting for depth-varying point-spread functions predicted by a strata interpolation method and a principal component analysis method*. SPIE, 2011, 19(23) : 23298-23314.